

荧光探针及流式分选法追踪胰腺癌细胞增殖的研究

米蕊芳 潘春晓 张俊文 刘福生 金贵善

摘要 **目的** 应用羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(5,6 - carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFSE) 荧光探针及流式分选的方法追踪胰腺癌细胞增殖情况。**方法** 应用低血清培养法(0.5%) 对细胞进行细胞周期同步化;利用 CFSE 染色追踪胰腺癌全基因组突变文库细胞增殖;并于一定的时间点,应用流式分选法分选增殖速度减慢细胞群;通过 CCK - 8 法检测分选前后的细胞增殖曲线。**结果** CFSE 探针可均匀染色胰腺癌细胞,呈现较强的绿色荧光;在 CFSE 荧光探针染色后的不同时间点(0、48、96 及 144h),胰腺癌细胞荧光强度呈现逐级衰减趋势;应用细胞饥饿法对细胞进行同步化后,细胞呈现更好的同步化衰减趋势;在一定的荧光衰减时间点(144h),通过流式分选从细胞突变文库中获得了胰腺癌增殖减慢细胞群;CCK - 8 实验显示,相对于分选前的细胞,分选出的荧光强度强的胰腺癌细胞群增殖速度明显减慢($P=0.006$)。**结论** CFSE 荧光探针可很好追踪胰腺癌细胞增殖,结合流式分选法可获得肿瘤突变文库中的增殖减慢细胞群。

关键词 胰腺癌 荧光探针 流式分选 ASPC - 1 细胞

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.008

Research on Tracing the Proliferation of Pancreatic Cancer Cells with the Fluorescence Probe Following FACS. Mi Ruifang, Pan Chunxiao, Zhang Junwen, et al. Brain Tumor Research Center, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract **Objective** To trace the proliferation of pancreatic cancer cell using the CFSE fluorescent dye and obtain the cells with low proliferation rate by fluorescence activated cell sorting (FACS). **Methods** We synthonized the cell cycles of pancreatic cancer cells through culturing them in the low serum medium (0.5%). We traced the proliferation rate of pancreatic cancer cells in the mutation library using the CFSE probe. We selected the cells with low proliferation rate in the pancreatic cancer library by FACS at the selected time point. We detected the cell proliferation rate using CCK - 8 method. **Results** CFSE dyed the pancreatic cancer cells evenly with high green fluorescence intensity. The fluorescence intensity was gradually attenuated at the time point of 0, 48, 96 and 144h. The cell cycles of the pancreatic cancer cells were synthonized when starved in the low serum medium for 48 h. And the cells with low proliferation rate were successfully selected following FACS after tracing for 144 hours with CFSE in vitro. The proliferation rate of the selected cells was significantly decreased compared with the original pancreatic cancer cells($P=0.006$). **Conclusion** CFSE fluorescent dye can be used to trace the proliferation of the pancreatic cancer cells, and the cell with low proliferation rate is successfully selected with CFSE dye following FACS.

Key words Pancreatic cancer; Fluorescent dye; FACS; ASPC - 1 cells

胰腺癌是消化系统预后最差的恶性肿瘤之一。胰腺癌患者的生存时间仍没有得到改善,1 年和 5 年生存率分别为 25% 和 6% 左右,对于大多数的胰腺癌

患者(超过 80%),其诊断后的生存时间只有 6 ~ 10 个月^[1,2]。阐明胰腺癌发病机制、寻找适当的综合治疗策略是十分必要的。从某种意义上讲,肿瘤处于一种失控的过度增殖的状态,研究和控制肿瘤增殖的关键基因,进而达到控制肿瘤增殖的目的是肿瘤研究的重要方向^[3]。

CFSE 探针也可称为 CFDA SE(5,6 - carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) 即羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯,是一种可穿透细胞膜的荧光染料,当 CFSE 含有两个乙酸基团和 1 个 succinimidyl ester 功能基团时,不具有荧光性质,但具有细胞膜通透性,能够自由进入细胞;当其扩散进入细胞内环境,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302186,81372354);北京市自然科学基金资助项目(7151002);北京市神经外科研究所创新基金资助项目(所青年 - 2014 - 003);北京市医院管理局青年人才培养“青苗”计划(QML20150505)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院、北京市神经外科研究所脑肿瘤研究中心(米蕊芳、潘春晓、张俊文、刘福生、金贵善);100005 中国医学科学院基础医学研究所/清华大学医学部北京协和医学院基础学院病理学系(米蕊芳、潘春晓)

通讯作者:金贵善,电子信箱:guishanjin7@163.com

内源的酯酶将其乙酸基团水解,此时的 CFSE 分子具有很高的荧光活性,产生绿色荧光,却不再具有膜通透性;同时,CFSE 染料强度可以随着细胞的复制分裂在细胞中均匀分配稀释减弱,从而可以用于追踪细胞的增殖情况^[4, 5]。

材料与方法

1. 材料:①ASPC-1 人胰腺癌细胞株购自中国医学科学院;②CEDA, SE (Invitrogen: C1157), DMSO 溶解保存;③胰腺癌 ASPC-1 细胞全基因组突变文库由本实验室构建。

2. CFSE 探针的配制过程:在 25mg CFSE 染料中加入 9ml 刚打开的 DMSO 液,充分混匀,配制成为 5mmol/L 的储备液,分装到 1.5ml 的 eppendorf 管中, -20℃ 避光保存。

3. CFSE 染色胰腺癌 ASPC-1 细胞:收集对数生长期的细胞,并用 PBS 洗两次;用含 0.1% BSA/PBS 液(37℃ 预热)重悬细胞,细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$;加入浓度为 5mmol/L 的 CFSE 原液,使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 37℃ 避光染色 10min。染色后加入 5ml 冰上预冷的正常培养基,冰上静置 5min 终止反应。离心,弃去上清,用正常培养基液洗 3 次后接种到培养皿上培养。

4. 细胞周期同步化实验:收集对数生长期的 ASPC-1 细胞或 AsPC-1 突变库细胞,接种到培养皿中,细胞的汇合度大约为 50%,加入低浓度(0.5%)的血清培养箱培养 48h,进行下一步的 CFSE 荧光染色实验。

5. 流式分析及分选实验:流式分析应用流式分析仪进行(Accuri C6 流式细胞仪)。流式分选通过流式分选仪(Becton-Dickinson, Stockholm, 瑞典)来分选。所分选细胞用含 20% FBS 和双倍双抗的 DMEM 液收集。收集后立即培养于正常的培养液中。

6. CCK-8 细胞增殖实验:分选后的细胞及其对照细胞接种到 96 孔板中($3 \times 10^3/\text{孔}$)进行增殖培养,并于不同的时间点进行 CCK-8 细胞活性检测实验。向每孔中(100 μl 培养液)加入 10 μl CCK-8 (日本 Dojindo Molecular Technologies 公司)原液,常规条件下孵育 1h,酶标仪(荷兰 LabSystems Dragon 公司)570nm 测定 A 值。

7. 统计学方法:使用 SPSS 16.0 进行统计学分析,数据应用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 增殖追踪探针 CFSE 染色胰腺癌 ASPC-1 细胞:ICFSE 探针使细胞着色后呈现绿色荧光,细胞着色稳定,荧光强度会随着细胞的复制分裂而逐渐稀释,这一特征可用于追踪细胞增殖。笔者应用 CFSE 探针染色人胰腺癌 ASPC-1 细胞,并接种到细胞培养皿中,待细胞贴壁后,观察细胞。可以看到染色后的 ASPC-1 细胞着色良好,其染色强度强且均匀,可用于细胞的增殖追踪(图 1)。

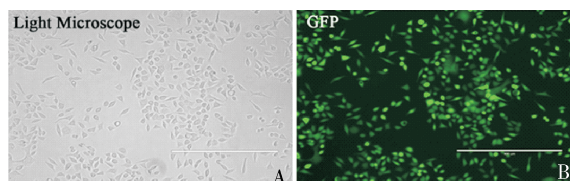


图 1 CFSE 染色 ASPC-1 细胞

A. 光镜下的 ASPC-1 细胞($\times 100$);B. 绿色荧光镜下 CFSE 染色后 ASPC-1 细胞,其染色强度强,染色较均匀,可用于细胞的增殖追踪

2. CFSE 探针追踪胰腺癌细胞增殖条件的确定:经 CFSE 探针染色后,分别在 0、48、96、144h 等时间点流式测定荧光强度,结果显示,ASPC-1 细胞随着时间递增,其荧光强度逐渐递减,呈现很好的细胞荧光同步衰减趋势(图 2A、B)。在 144h 时,衰减细胞荧光强度与没有染色的阴性对照相比依然有差别,差别很小,笔者选取细胞衰减 144h 为 CFSE 染色后的分选时间点(图 2A),将增殖速度减慢的细胞在此时间点从细胞群体中分选出来。为了优化 CFSE 探针追踪细胞增殖条件,笔者应用细胞饥饿法对细胞周期进行同步化,细胞饥饿可将细胞同步化到 G_1/G_0 期,并且对细胞的损伤较小。笔者选择应用 0.5% 的低血清条件对 ASPC-1 细胞进行细胞周期同步化。后期的流式分析显示经细胞周期同步化后,细胞群的染色更加稳定,细胞的同步衰减更一致(图 2B)。

3. CFSE 探针及流式分选法追踪分选得到胰腺癌增殖速度减慢细胞:应用 CFSE 探针染色追踪胰腺癌 ASPC-1 细胞突变文库,在染色后荧光衰减 144h 时间点,应用流式分选突变库中荧光强度高的细胞。根据增殖相关基因在基因组中的分布概率,选定分选细胞的比例为 2% ~ 5%(图 3)。分选后的细胞在正常培养基下进行培养。

4. 鉴定细胞分选所得增殖减慢细胞群:将所分选得到的细胞群进行细胞增殖实验。CCK-8 法测量所得胰腺癌细胞群的增殖曲线。分选后的增殖减慢细胞群同分选前的细胞群相比,细胞的增殖速度减

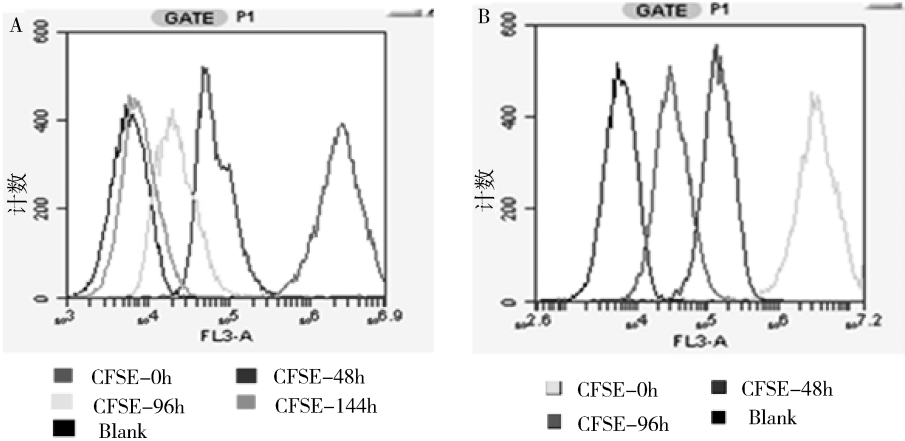


图 2 CFSE 探针追踪同步化及未同步化 ASPC - 1 细胞荧光衰减情况

A. ASPC - 1 细胞经 CFSE 荧光染色后,随着时间的递增(0、48、96、144h),绿色荧光逐渐衰减,并且细胞在荧光衰减 144h 后,细胞的荧光强度已接近阴性对照细胞的荧光强度;B. 细胞经细胞周期同步化后进行 CFSE 染色,细胞荧光衰减呈现很好的同步衰减趋势

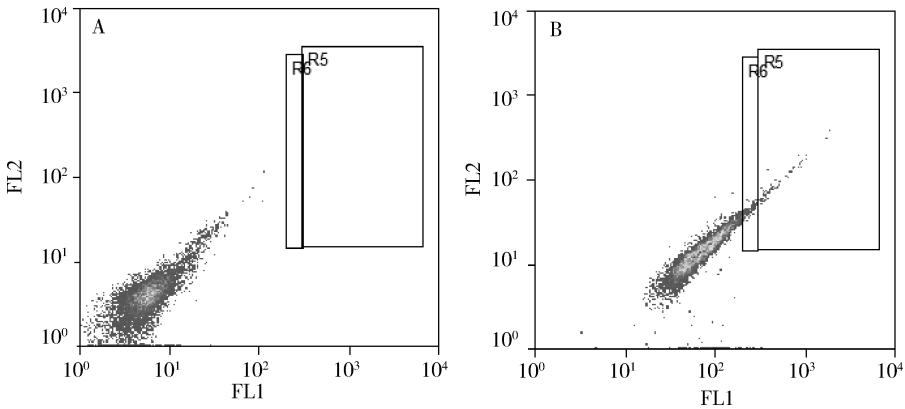


图 3 流式分选胰腺癌增殖减慢细胞

CFSE 染色后经 144h 衰减后进行流式分选。A. 未经 CFSE 染色的胰腺癌细胞;B. CFSE 染色后衰减 144h 后进行细胞分选时所选区域 R5、R6 门,对这两个区域细胞分别进行分选,两者共占总细胞数的 3% ~ 5%

慢,两者比较差异有统计学意义($P=0.006$,图 4)。

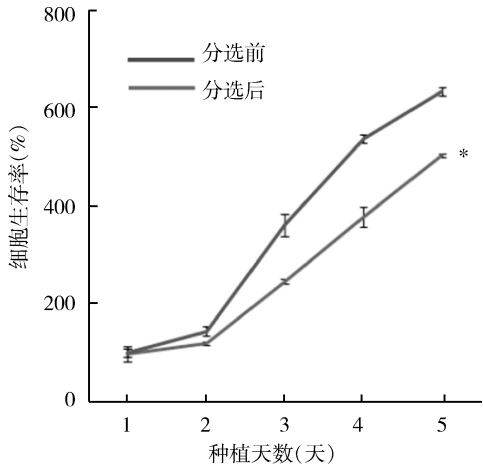


图 4 增殖减慢细胞群验证

分选后的 ASPC - 1 细胞与分选前的 ASPC - 1 细胞进行 CCK - 8 增殖实验,分选后的 R5 门区域细胞增殖速度明显低于分选前细胞;* $P=0.006$

讨 论

胰腺癌以其诊断后病情进展迅速,病死率高而著称,是目前预后最差的消化系统肿瘤,被称为癌症之王,因此研究胰腺癌的发生、发展机制及其分子生物学特性,特别是研究胰腺癌增殖的关键基因进而达到控制胰腺癌增殖的目的,进一步为患者提供有效的诊治手段、提高患者生存率,具有重要的临床意义^[6~8]。

CFSE 探针是可渗透入细胞的荧光素,可与细胞质中的丝氨酸、精氨酸等结合,从而可以使胞质均匀着色。并且 CFSE 探针进入细胞后不会外渗,其含有的 succinimidyl ester 基团能与胞内细胞骨架蛋白中的游离胺基反应,形成具有荧光的蛋白复合物^[5,9]。因此,当细胞进行分裂增殖时,具有荧光的胞质蛋白平均分配到两个第 2 代细胞中,这样与第 1 代细胞相比,其荧光强度便会减弱至一半,以此类推,分裂得到的第 3 代细胞的荧光强度便会比第 2 代细胞再次减

弱至一半。这种现象可以在 488nm 的激发光下,采用流式细胞仪检测分析。CFSE 探针多用于淋巴细胞的增殖研究中^[10]。本研究首次将 CFSE 染料应用到胰腺癌的增殖追踪研究上,这也是本研究的创新点之一。

在胰腺癌突变文库中,存在有增殖减慢的细胞群。这部分细胞在应用 CFSE 探针追踪时,因为本身的增殖速度慢,在一定的追踪时间点内,会因为传代的次数少而带有较强的免疫荧光。在全基因组基因中,与增殖相关的基因占很大的比例,文献报道筛选出肿瘤细胞中与增殖相关的基因约有 695 个基因,占到了全基因组基因的 3% 左右。笔者应用流式分选的方法进行增殖减慢克隆细胞的分选,所分选的细胞为整个群体细胞的 3% ~ 5%,以尽可能选中其中的增殖减慢细胞克隆^[7, 11]。

综上所述,笔者摸索确定了 CFSE 追踪胰腺癌细胞增殖的方法,并结合流式分选法从胰腺癌突变细胞文库中分选得到了胰腺癌增殖减慢细胞群。进一步的实验可以从此细胞群中克隆得到调控胰腺癌增殖速度减慢的相关基因乃至关键基因,从而为胰腺癌临床上的诊断、治疗和预防提供实验基础。

参考文献

- 1 Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29
- 2 Dunne RF, Hezel AF. Genetics and biology of pancreatic ductal ade-

- nocarcinoma[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2015, 29(4): 595-608
- 3 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70
- 4 Luzyanina T, Cupovic J, Ludewig B, *et al.* Mathematical models for CFSE labelled lymphocyte dynamics: asymmetry and time-lag in division[J]. *J Math Biol*, 2014, 69(6-7): 1547-1583
- 5 Yates A, Chan C, Strid J, *et al.* Reconstruction of cell population dynamics using CFSE[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 196
- 6 Schmidt-Hansen M, Berendse S, Hamilton W. Symptoms of pancreatic cancer in primary care: a systematic review[J]. *Pancreas*, 2015, Epub ahead of print
- 7 Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, *et al.* Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(10): 1218-1249
- 8 Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, *et al.* Molecular mechanism of pancreatic cancer - understanding proliferation, invasion, and metastasis[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2010, 395(4): 295-308
- 9 Hawkins ED, Hommel M, Turner ML, *et al.* Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9): 2057-2067
- 10 Bocharov G, Luzyanina T, Cupovic J, *et al.* Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 264
- 11 Jones S, Zhang X, Parsons D W, *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses[J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1801-1806

(收稿日期: 2015-01-22)

(修回日期: 2015-02-23)

lncRNA PCA3 高表达促进前列腺癌细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡

李 丹 兰 波 康 南 詹启敏

摘 要 **目的** 探究 lncRNA PCA3 高表达在前列腺癌细胞中的功能。**方法** 将构建的含有 PCA3 全长的 pcDNA3.1 质粒及对照瞬时转染 PC3 细胞,提取细胞总 RNA 进行反转录,并采用实时定量 PCR 检测转染效率;采用 MTS 的方法检测 PCA3 高表达对细胞增殖能力的影响;利用 Transwell 实验检测 PCA3 高表达对细胞迁移能力的影响;采用流式细胞仪检测 PCA3 高表达对细胞凋亡的影响。**结果** 高表达后 lncRNA PCA3、PC3 细胞的增殖、迁移能力增强,UV 诱导的凋亡降低。**结论** lncRNA PCA3 高表达可以促进 PC3 细胞的恶性表型。

关键词 PCA3 lncRNA 前列腺癌 细胞迁移 细胞凋亡

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.009

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201567)

作者单位:100021 中国医学科学院肿瘤医院/北京协和医学院分子肿瘤学国家重点实验室

通讯作者:詹启敏,电子信箱:zhanqimin@pumc.edu.cn